

CHROMATOGRAFICZNE METODY IZOLACJI I IDENTYFIKACJI FLAWONOIDÓW I SAPONIN

Michał Machowski¹, Dorota Kaliszewska^{1*}, Anna Kiss²

Wydział Farmaceutyczny, Warszawski Uniwersytet Medyczny, ul. Banacha 1, 02-097 Warszawa

¹Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej i Analitycznej

²Katedra Farmakognozji i Molekularnych Podstaw Fitoterapii

*Autorka korespondująca: : tel. +22 5720784, e-mail: dorota.kaliszewska@wum.edu.pl

Otrzymano 20.01.2010, zaakceptowany 12.07.2010, zamieszczony 3.08.2010

STRESZCZENIE

W ciągu kilku ostatnich lat liczne nowe metody chromatograficzne stały się dostępne w analizie chemicznej flawonoidów i saponin. Metody te nie tylko skracają czas rozdzielania tych związków, lecz umożliwiają izolację wcześniej nieznanymi lub niestabilnymi składnikami ekstraktów surowców roślinnych. Flawonoidy i saponiny są głównymi bioaktywnymi związkami roślin, posiadającymi właściwości przeciwutleniające, przeciwbakteryjne i owadobójcze. Przedstawiony przegląd literaturowy omawia chromatograficzne metody izolacji i identyfikacji flawonoidów i saponin.

SŁOWA KLUCZOWE: flawonoidy, saponiny, HPLC

ABSTRACT

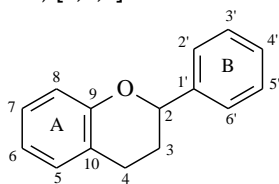
CHROMATOGRAPHIC METHODS OF ISOLATION AND IDENTIFICATION OF FLAVONOIDS AND SAPONINS

Within the last few years numerous new chromatographic techniques have become available for the flavonoid and saponin chemistry. They not only reduce the separation time, but enable the isolation of previously unknown or unstable constituents from crude plant extracts. Flavonoids and saponins are the main bioactive components of plants, responsible for antioxidant, antimicrobial and insecticidal activity. In the presented review chromatographic methods of isolation and identification of flavonoids and saponins are discussed.

KEYWORDS: flavonoids, saponins, HPLC

1. Budowa, występowanie i właściwości farmakologiczne flawonoidów

Flawonoidy to licząca ponad 4 tysiące naturalnie występujących związków grupa substancji o charakterze barwników występujących w roślinach, pochodnych benzo- γ -pironu (chromonu) [1,2,3].

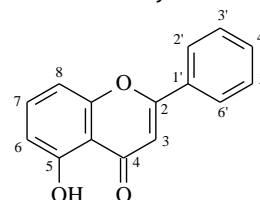


Ryc. 1. 2-Fenylchroman.

Podstawowy szkielet tych związków składa się z 15 atomów węgla tworzących ugrupowanie w którym można wyróżnić układ pierścienia benzenowego A oraz układ fenylopropanu, (pierścień B + trzy atomy węgla) (Ryc. 1) [1]. Związki te dzielą się na poszczególne klasy ze względu na położenie pierścienia fenylowego i stopień utlenienia pierścienia pironowego.

W roślinach flawonoidy występują przede wszystkim w formach glikozydów, związanych glikozydowo z częścią cukrową poprzez grupę hydroksylową w położeniu 3, 5, 7, 3' lub 4' tworząc O-glikozydy, lub glikozydowo w położeniu 8, 6 tworząc C-glikozydy [3]. Istnieją również połączenia między dwoma aglikonami przez atom węgla lub tlenu nazy-

wane biflawonoidami. Przykładowa budowa aglikonu flawonu została przedstawiona na Ryc. 2.



Ryc. 2. Ogólna budowa flawonu.

Korzystnym biologicznym działaniem flawonoidów jest ich wpływ na układ krążenia oraz funkcjonowanie naczyń krwionośnych [4,5]. Istnieje udowodniony wpływ preparatów otrzymanych z gatunku *Crataegus oxyacantha*, zawierających m.in. witeksynę, na mięsień sercowy poprzez zwiększenie kurczliwości serca oraz zwiększenie jego wydolności. Preparaty z tej rośliny posiadają również działanie ochronne w przypadku arytmii [6].

Kompleks flawonolignanów wyizolowanych z *Silybum marianum* zwany wspólnie silimaryną posiada działanie antyhepatotoksyczne. Flawonolignany zawarte w tej roślinie zapobiegają m.in. marskości wątroby. Stosuje się je ogólnie w profilaktyce chorób wątroby i w przypadkach gdy miało miejsce działanie szkodliwe na ten narząd, np. po zóttacze czy chemioterapii [4].

Ipriflawony stanowią grupę syntetycznych pochodnych izoflawonów o słabym działaniu estrogenowym. Istnieją

dane o bardzo korzystnym działaniu tych związków w leczeniu osteoporozy [7].

Opublikowano także wiele prac na temat wpływu flawonoidów na komórki nowotworowe. W jednej z publikacji badano wpływ 36 flawonoidów na proliferację, apoptozę i cytotoxycznosc w koloniach komórek raka jelit. Stwierdzono, że testowane flawonoidy hamują wzrost kolonii w warunkach *in vitro*, jednak nie koreluje to ani z budową poszczególnych flawonoidów, ani nawet z silnymi właściwościami antyoksydacyjnymi tych związków [8].

Wykazano działanie przeciwzapalne wielu flawonoidów, polegające na wpływie na metabolizm kwasu arachidowego w płytkach krwi [4].

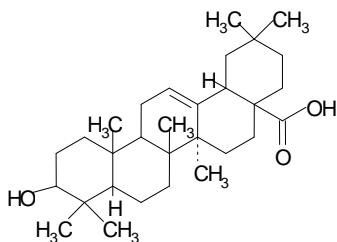
Działanie przeciwrzodowe wykazano u flawonoidów z grupy flawonów i flawononów. Hamowały one wzrost *Helicobacter pylori* oraz sekrecję kwasu solnego przez komórki okładzinowe żołądka spowodowaną działaniem m.in. histaminy [4].

Flawonoidy takie jak kwercytryna czy hiperozyd wykazują działanie moczopędne [4].

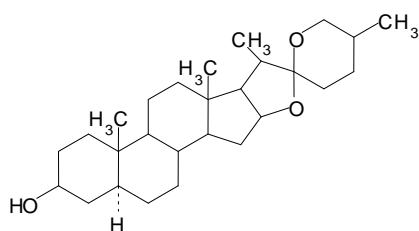
2. Budowa, występowanie i właściwości farmakologiczne saponin

Saponiny to grupa związków glikozydowych, charakteryzujących się szkieletem węglowym składającym się z 30 atomów węgla, będących pochodną skwalenu, do którego dołączone są grupy glikozydowe [1,3,9].

Cząsteczka saponiny składa się z aglikonu zwanego sapogeniną lub sapogenolem oraz części cukrowej zawierającej nawet kilkanaście cząsteczek monosacharydów. Saponiny dzielimy na saponiny triterpenowe (Ryc. 3) i steroidowe (Ryc. 4). Saponiny triterpenowe możemy podzielić ze względu na budowę aglikonu na pochodne oleanu, ursanu, frydelanu, lupanu, dammaranu oraz hopanu. Saponiny steroidowe ze względu na budowę aglikonu dzielimy na pochodne furostanu i spirostanu. Ze względu na liczbę łańcuchów cukrowych możemy też podzielić saponiny na monodesmozydy, bidesmozydy i tridesmozydy. Podział ten nie wyczerpuje tematu klasyfikacji saponin. Próbę klasyfikacji saponin opartą na biosyntezie szkieletu węglowego aglikonu można znaleźć w publikacji Vincken i in. [9].



Ryc. 3. Sapogenina triterpenowa.



Ryc. 4. Sapogenina steroidowa.

W grupie saponin podobnie jak w grupie flawonoidów znajdują się związki o bardzo różnych właściwościach fizjologicznych. Uważa się, że saponiny obok polifenoli są głównymi związkami odpowiedzialnymi za efekty lecznicze tradycyjnych chińskich leków [10]. Aktywność biologiczna związków saponinowych jest dobrze udokumentowana. Charakterystyczne jest działanie hemolityczne, związane z rodzajem aglikonu oraz liczbą i budową łańcuchów cukrowych [10]. Odnotowano również właściwości przeciwgrzybiczne, przeciwbakteryjne i przeciw pasożytnicze saponin. Działanie antyproliferacyjne na wszystkich etapach rozwoju *Leishmania infantum* wykazały saponiny wyizolowane z rośliny *Hedera helix* [10]. Niektóre saponiny były również badane pod kątem wykorzystania w leczeniu chorób nowotworowych. Działanie przeciwrakowe i cytotoxyczne na komórki raka płaskokomórkowego (HSC-2) wykazano np. u saponin wyizolowanych z rośliny *Camassia leichtlinii* [10].

3. Metody ekstrakcji flawonoidów i saponin

Ekstrakcję flawonoidów i saponin przeprowadza się z próbek stałych, jak np. surowce roślinne, stałe postacie preparatów ziołowych oraz z próbek ciekłych, np. z płynnych postaci leków, napojów czy płynów ustrojowych [11].

Izolacji flawonoidów i saponin z próbek stałych dokonuje się stosując następujące metody:

a. Ekstrakcja flawonoidów i saponin z materiału roślinnego przy pomocy rozpuszczalnika

Do bezpośredniej ekstrakcji saponin z surowców stosuje się metanol lub etanol o różnych stężeniach, rzadziej chloroform lub aceton. Flawonoidy z surowców roślinnych ekstrahuje się zwykle metanolem, używa się również octanu etylu [3].

Wariantami izolacji flawonoidów i saponin z próbek stałych za pomocą cieczy są:

- Metoda z użyciem aparatu Soxhleta

Wykorzystanie aparatu Soxhleta opisane jest w wielu publikacjach do ekstrakcji związków z materiału roślinnego, często stanowiącej wstęp do stosowania innych metod ekstrakcyjnych oraz późniejszego frakcjonowania otrzymanych ekstraktów.

Za pomocą aparatu Soxhleta, Shoeb i in. [12] poddawali ekstrakcji zmielone, suche, naziemne części rośliny *Centaurea gigantea* zawierające związki fenolowe, w tym 5 flawonoidów, które to związki po dalszym frakcjonowaniu z użyciem kolumny SPE poddano separacji HPLC i zidentyfikowano przy pomocy NMR. Jako rozpuszczalnik do aparatu wykorzystano kolejno n-heksan, metanol oraz dichlorometan.

Ciągła ekstrakcja rozpuszczalnikiem w aparacie Soxhleta oraz metoda maceracji zostały użyte do wyizolowania saponin z *Quillaja saponaria* w pracy Copaja i in. [13]. Dokonując analizy ilościowej z wykorzystaniem metody HPLC, ze 100 g suchego materiału roślinnego otrzymanego m.in. z kory i gałęzi otrzymano 2,3 g saponin wykorzystując metodę Soxhleta oraz 15,8 g używając metody maceracji (czas ekstrakcji wynosił odpowiednio 10 godz. dla pierwszej metody i 24 godz. dla drugiej).

- Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomagana promieniowaniem mikrofalowym (MAE)

Opracowanie warunków ekstrakcji wspomaganej mikrofalami flawonoidów z korzeni *Astragalus monogolicus* oraz porównanie jej z innymi tradycyjnymi metodami ekstrakcji (ekstrakcje: na aparacie Soxhleta, wspomagana ultradźwiękami i refluksyjna) było tematem pracy Xiao i in. [14]. Najlepszy odzysk metodą MAE flawonoidów z materiału, bez degradacji związków, stwierdzili oni po dwukrotnej ekstrakcji sproszkowanego materiału roślinnego 90% etanolem w temperaturze 110°C. Czas procedury wynosił 25 min., a łączna zawartość czterech głównych flawonoidów wyniosła 1,190 ± 0,042 mg/g. Lepszy odzysk uzyskano jedynie metodą Soxhleta, ale po ponad czterokrotnie dłuższym czasie ekstrakcji.

Przystosowania metody MAE do triterpenowych saponin z *Ganoderma atrum* podjęto się w pracy Chen i in. [15]. Wyniki porównano z ilością wyekstrahowanych saponin z zastosowaniem innych metod: ekstrakcji z wytrząsaniem, ekstrakcji za pomocą CO₂ w stanie nadkrytycznym i ekstrakcji wspomaganej ultradźwiękami. Największy odzysk na poziomie 96,8% oraz najkrótszy czas ekstrakcji wynoszący 5 min. otrzymano stosując MAE w uprzednio zoptymalizowanych warunkach.

- Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomagana ultradźwiękami (UAE)

W pracy autorstwa Wei i in. [19], w której analizowano saponiny wraz z innymi związkami w formule ziołowej Fufang Danshen, osiągnięto najlepsze rezultaty ekstrakcji stosując UAE. Metodę porównywano z ekstrakcją w aparacie Soxhleta i ekstrakcją refluksyjną. Przy zastosowaniu tej metody udało się wyekstrahować ze sproszkowanego leku, stosując 70% metanol, w przybliżeniu ilościowo 12 związków, w tym 4 saponiny, w czasie 30 min.

- Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika z próbki zmieszanej z wypełniaczem (MSPD)

MSPD pozwala na jednoczesną ekstrakcję i oczyszczanie próbki. Zwykle używana tylko do analizy pestycydów była też badana pod względem użyteczności w ekstrakcji flawonoidów z wysuszonych korzeni *Astragalus membranaceus*, gdzie wykazano jej dużą skuteczność w porównaniu z ekstrakcją metodą Soxhleta i metodą ultrasonifikacji [11].

Skuteczność w izolacji saponin może potwierdzić praca autorstwa Sandvoss i in., w której opisano zastosowanie tej metody do ekstrakcji asterosaponin z rozgwiazdy *Asterias Rubens* [16].

b. Ekstrakcja za pomocą płynu w stanie nadkrytycznym (SFE)

W pracy autorstwa Scalia i in. [17] porównano ekstrakcję za pomocą CO₂ w stanie nadkrytycznym z innymi tradycyjnymi metodami pod względem przydatności w analitycznej i preparatywnej ekstrakcji różnych grup związków z kwiatów *Matricaria chamomilla*. Ze związków flawonoidowych oznaczano ilość wyizolowanej apigeniny i 7- glukozydu apigeniny. Uznano, że dla frakcji flawonoidowej metoda ta jest szybka, pozwala na względnie duży odzysk tych związków (w czasie 30 min. otrzymano 71,4% apigeniny w stosunku do trwającej 6 godz. ekstrakcji w aparacie Soxhleta i 124,6% w stosunku do maceracji trwającej 3 dni)

i umożliwiają uzyskanie czystszych ekstraktów w porównaniu z pozostałymi, badanymi metodami ekstrakcji.

Do ekstrakcji flawonoidów i saponin z cieczy, jak też dalszego oczyszczania i frakcjonowania ekstraktów płynnych otrzymanych wcześniej wymienionymi metodami, stosuje się następujące sposoby:

a. Ekstrakcja do fazy stałej (SPE)

SPE jest stosowana na wielu etapach przygotowania próbek przed analizą. Stosowana była do wyodrębnienia określonych frakcji w tym flawonoidowych w analizie ajurwedyjnego leku Chyavanprash (zawierającego w swym składzie min. *Desmodium gangeticum*) [18], jak też do końcowego oczyszczania roztworu aglikonów flawonoidów, otrzymanego uprzednio w wyniku ekstrakcji rozpuszczalnikiem wspomaganej ultradźwiękami [20].

Na kolumnkach C₁₈ Sep-Pak można oczyścić i zatężyć saponiny przepuszczając najpierw wodę by pozbyć się cukrów, potem 40% metanol by usunąć większość flawonoidów i fenolokwasów, a następnie czysty metanol by wymyć oczyszczone już saponiny. Użycie SPE w analizie saponin w stosunku do próbek zawierających również inne związki czynne jest ogólnie zalecane [21].

b. Mikroekstrakcja do fazy stałej (SPME)

SPME jest to jedna z odmian ekstrakcji do fazy stałej. Wykorzystuje się tu specjalną formę sorbentu (najczęściej polidimetylosiloksan i poliakryl), który nanoszony jest na włókna szklane lub kwarcowe, co polepsza proces rozdziału. Metody tej używano do ekstrakcji flawonoidów, m.in. genisteiny i daidzeiny, z ludzkiego moczu [11].

c. Preparatywna chromatografia kolumnowa

Kolumna Sephadex LH-20 została zastosowana do dalszego rozdziału frakcji octano-etylowej otrzymanej z ekstraktu metanolowego z rośliny *Lepechinia graveolens*, zawierającej m.in. flawonoidy, w tym 7-O-glukouronid luteoliny, zidentyfikowany później jako jeden z głównych związków wymiatających wolne rodniki w tej roślinie [22].

4. Metody rozdziału i identyfikacji flawonoidów oraz saponin metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC)

Wysokosprawna chromatografia cieczowa (HPLC) jest metodą analityczną pozwalającą na rozdział różnorodnych mieszanin związków chemicznych. Jest powszechnie wykorzystywana w analizie substancji pochodzenia roślinnego ze względu na dobrą czułość i uniwersalność. HPLC jest metodą cały czas rozwijaną, również poprzez łączenie jej z innymi technikami jak np. spektrometria masowa czy spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego.

4.1. Analiza flawonoidów metodą HPLC

W pracy autorów Harnly i in. [23] można znaleźć ocenę analizy flawonoidów metodą HPLC przedstawioną na podstawie jednej z ostatnio utworzonych baz publikacji o flawonoidach. Wynika z niej, że prawie każda ze 199 metod rozdziału HPLC opisanych w publikacjach poświęconych identyfikacji flawonoidów, posiada własny schemat separacji.

Tabela 1. Różne warunki rozdziatu chromatograficznego flawonoidów metodą HPLC.

Flawonoidy	Próbka	Metoda	Warunki chromatograficzne	Ref.
Flawony	<i>Cynara cardunculus</i> -liście.	HPLC-DAD i HPLC-MS	Eluent: H ₂ O/CH ₃ CN Kolumna: C ₁₈ ; temp. kol. = 27 °C V = 0,6 ml/min; czas analizy = 30 min.	[24]
Flawonole	<i>Ilex paraguariensis</i> -liście.	HPLC-DAD	Eluent: H ₂ O - CH ₃ COOH 98:2/CH ₃ OH-CH ₃ COOH 98:2 Kolumna: C ₁₈ V = 1,2 ml/min; czas analizy = 45 min.	[25]
Flawonole	Oliwa z oliwek.	HPLC-DAD i HPLC-MS	Eluent: H ₂ O - CH ₃ COOH (98:2, v/v)/CH ₃ OH - CH ₃ CN (1:1, v/v) Kolumna: C ₁₈ ; temp. kol. = 25 °C V = 0,5 ml/min; czas analizy = 70 min.	[26]
Flawonony	Rodzaj <i>Thymus</i> - liście.	HPLC-DAD	Eluent: 2% wodny roztwór CH ₃ COOH/CH ₃ OH:CH ₃ COOH:H ₂ O (18:1:1, v/v/v) Kolumna: C ₁₈ ; temp. kol. = 30 °C V = 1,0 ml/min; czas analizy = 45 min.	[27]
Izoflawony	Danggui Buxue Tang	HPLC-DAD-ELSD	Eluent: wodny roztwór HCOOH (0,3%, v/v)/CH ₃ CN Kolumna: C ₁₈ ; temp. kol. = 20 °C V = 1,0 ml/min; czas analizy = 82 min.	[28]

Wybór przykładowych publikacji dotyczących analizy flawonoidów metodą HPLC został przedstawiony w Tabeli 1.

4.1.1. Rodzaje stosowanych kolumn

Do analizy flawonoidów używa się głównie kolumn umożliwiających prowadzenie chromatografii podziałowej w odwróconym układzie faz (RP). Stosuje się tu przede wszystkim kolumny z wypełnieniem związaną fazą oktacylosilanową C₁₈. Na rynku dostępna jest bardzo duża liczba kolumn tego typu, różniących się właściwościami separacyjnymi.

Opisywane są również inne rodzaje kolumn używanych do rozdziatu flawonoidów, ale stanowią one zdecydowaną mniejszość. Opisano zastosowanie kolumny Zorbax-CN ze związaną fazą stacjonarną cyjanopropylową do określenia profilu chemicznego szesnastu gatunków z rodzaju *Ballota* [29]. Natomiast Pellati i in. [30] w celu rozdziatu związków czynnych, w tym m.in. rutyny, kwercetyny i hyperozydu, w metanolowym ekstrakcie z *Hypericum perforatum* zastosowali w sposób innowacyjny jako fazę stacjonarną polietylenoglikol (PEG). Metoda rozdziatu z użyciem tej fazy została zwalidowana i uznano, że nadaje się do zastosowania w kontroli jakości związków czynnych obecnych w ekstraktach z tej rośliny. Specjalnej, krzemowej, wysoce hydrofilowej fazy stacjonarnej pokrytej resztami polikarboxylowymi (poly(7-oxonorborene-5,6-dicarboxylic acid-block-norborene)) użyli Huck i in. w analizie aglikonów flawonoidów, otrzymując dobrą separację w krótkim czasie [31]. W analizie flawonoidów używano również kolumn z wypełnieniem żelem krzemionkowym i Sephadexem [11].

4.1.2. Rodzaje stosowanych faz ruchomych i dodatków

Z przeglądu publikacji tematycznych wynika, że analizę flawonoidów z wykorzystaniem HPLC przeprowadza się głównie w odwróconym układzie faz. Najczęściej wykorzystuje się jako fazę ruchomą mieszaninę dwóch rozpuszczalników: wody oraz mniej polarnego rozpuszczalnika o

większej sile elucji jak np. metanol lub acetonitryl oraz dodatek składnika modyfikującego pH fazy ruchomej.

Jako składnika modyfikującego pH używa się głównie buforów mrówczanowych i octanowych [11], ale również kwasu octowego [25], kwasu trifluoroctowego (TFA) [20] i kwasu fosforowego (V) [32].

Kwas trifluoroctowy zastosowano w pracy Kakasy i in. w analizie związków czynnych, w tym antocyjanów: delfinidyny i pelargonidyny obecnych w gatunkach *Dracocephalum moldavica* i *D. ruyschiana* [20]. Jak wyjaśniają Huck i in. [31] dodanie TFA o końcowym stężeniu 20 mM do zastosowanego przez nich eluentu - woda/acetonitryl, zapobiegło deprotonacji grup fenolowych pięciu aglikonów flawonoidów, specjalnie wybranych do badań ze względu na ich duże rozpowszechnienie w świecie roślinnym.

Dodatek TFA o końcowym stężeniu 0,05% zapobiegł wzdłuż Merken i in. [33] ogonowaniu pików w trakcie analizy metodą HPLC-UV siedemnastu najczęściej występujących w żywności aglikonów flawonoidów. W pracy tej autorzy zastosowali również trzy różne rozpuszczalniki w fazie ruchomej: wodę, acetonitryl i metanol, co stanowi rzadziej używany układ wobec zwykle zalecanej liczby dwóch rozpuszczalników.

4.1.3. Prędkość przepływu fazy ruchomej

Do analizy związków flawonoidowych najczęściej stosowana jest prędkość przepływu fazy ruchomej wynosząca 1 ml/min [27,28]. Prędkość równą 2 ml/min zastosowano w analizie flawonoidów z liści *Betula pendula* i *Betula pubescens* [34], natomiast prędkości 0,6 ml/min użyto w oznaczeniu flawonów z liści rośliny *Cynara cardunculus* [24].

4.1.4. Temperatura kolumny

W identyfikacji flawonoidów najczęściej stosuje się temperaturę pokojową, ale stosowano również temperatury wyższe w celu uzyskania krótszych czasów retencji badanych związków i skrócenia czasu analizy [10]. Liu i in.

[35] badali metodą HPLC-UV 10 głównych flawonoidów występujących w drewnie *Dalbergia odorifera*, separacja tych związków uległa poprawieniu po podniesieniu temperatury kolumny do 35 °C.

4.1.5. Czas analizy

Czas analiz jest bardzo różny w kolejnych publikacjach tematycznych, co jest zrozumiałe ze względu na odmienne warunki prowadzenia rozdzielania HPLC, jak i różnorodność oznaczanych związków.

W większości nowych publikacji przy wyborze stosowanych gradientów najczęściej nie kierowano się rozważeniami teoretycznymi, ale działano według zasady „trial-and-error” (prób i błędów) [11]. Przeglądając publikacje można zauważyć, że czasy analizy najczęściej mieszczą się w przedziale od 25 min. do 1 godziny.

Autorom pracy [31] udało się dokonać separacji mieszaniny flawonoidów, w skład której wchodziły takie związki jak: kwercytryna, mirycetyna, kwercetyna, kaemferol i akacetyna, w czasie poniżej 5 min. W literaturze opisano też analizy mieszanin flawonoidów trwające kilkadziesiąt minut. Przykładem jest praca, w której analiza izoflawonów zawartych w sosie sojowym trwała 340 min. [11].

4.1.6. Różne rodzaje detekcji stosowane w analizie flawonoidów metodą HPLC

a. Detekcja w nadfiolecie

Ważna przy detekcji UV jest rejestracja chromatogramów przy odpowiednich długościach fali dla danego związku, zwłaszcza jeśli przeprowadzona jest analiza ilościowa. Widma UV flawonoidów posiadają dwa maksima. Jedno odpowiadające pierścieniom aromatycznym przy długości fali 240-285 nm i drugie w zakresie 300-550 nm zależne od podstawień [11].

W pracy autorów Pinelli i in. [24] oznaczano ilościowo metodą HPLC-DAD 7-O-glukouronid luteoliny i 7-O-malonyloglukozyd luteoliny używając cynarozylu jako wzorca oraz 7-O-glukouronid apigeniny i 7-O-rutozyd apigeniny z użyciem jako wzorca 7-O-glukozydu apigeniny. Detekcji wszystkich wyżej wymienionych związków dokonano przy długości fali 350 nm.

Analiza jakościowa flawonoidów z detekcją UV posiada pewne ograniczenia. O ile teoretycznie jest możliwe odróżnienie po widmie UV aglikonów należących nawet do tej samej podklasy flawonoidów, to dokładna charakterystyka budowy glikozydu, czy też określenie dokładnego układu podstawników przy głównych pierścieniach, są już niemożliwe [11].

b. Detekcja fluorescencyjna

Detekcja przy pomocy detektora fluorescencyjnego jest najprostsza wtedy, gdy związek posiada naturalną zdolność do fluorescencji. Wśród związków flawonoidowych zdolność taką posiadają jedynie: izoflawony, katechiny, flawonoidy z grupą hydroksylową w pozycji 3 i flawony metoksyloowane [11].

W swojej pracy Rodriguez-Delgado i in. [36] oznaczali przy użyciu HPLC z detektorem fluorescencyjnym zawartość związków czynnych, w tym flawonoidów, w różnych gatunkach win. Zastosowanie tej metody detekcji pozwoliło według autorów osiągnąć większą czułość i selektywność w stosunku do niektórych związków (np. katechiny) w po-

rownaniu do detekcji UV. Pewne związki były jednak niewykrywalne tą metodą ze względu na brak lub słabą zdolność do naturalnej fluorescencji (mirycetyna, kwercetyna, kwercytryna i kaemferol).

Hollman i in. [37] zastosowali kompleksowanie m.in. kwercetyny (flawonol) z kationami glinu. Taki kompleks wykazuje wysoką fluorescencję, dzięki czemu możliwe było zastosowanie detektora fluorescencyjnego. Osiągnięto limit detekcji 2 ng/ml dla próbek z osocza krwi i 3 ng/ml dla próbek uzyskanych z moczu.

c. Spektrometria mas (MS)

Spektrometria mas ma porównywalny limit detekcji do detekcji UV [23]. Najczęściej stosuje się połączenie LC-MS do potwierdzania składu analizowanych flawonoidów, lub używa się tandemowego MS-MS do określania budowy nieznanymi związków.

Wykorzystanie połączenia LC-DAD-MS lub LC-MS-MS umożliwia określenie budowy glikozydów flawonoidowych dzięki określeniu liczby i rodzaju jednostek cukrowych w związku [23]. Zastosowanie detekcji MS w układzie LC-UV-MS-MS pozwoliło Stobieckiemu i in. [38] na poznanie podstawień części cukrowych do aglikonu flawonoidów występujących w liściach *Arabidopsis thaliana*.

d. Magnetyczny rezonans jądrowy (LC-NMR)

Połączenie LC-NMR jest niezbędne dla pełnego poznania budowy związków flawonoidowych, umożliwiając rozróżnienie izomerów oraz układu podstawników, do którego to celu połączenie LC-DAD-MS-MS jest nie wystarczające [11,39].

Najczęściej stosowana przy tej detekcji jest opcja zatrzymanego przepływu w celu rejestracji widma NMR, która może trwać nawet do kilku dni [11]. Jak twierdzi Moco i in. [39] rozróżnianie na podstawie widma ¹H NMR części cukrowej glikozydów flawonoidowych w bezpośredniej identyfikacji jest mało praktyczne ze względu na zbyt złożone sygnały rezonansowe, pozwala jednak wykluczyć pewne grupy cukrowe w trakcie badania tych związków.

4.2. Analiza saponin metodą HPLC

Wybór publikacji dotyczących analizy HPLC saponin został przedstawiony w Tabeli 2.

4.2.1. Rodzaje stosowanych kolumn

Podobnie jak w przypadku flawonoidów, w większości prac separacja saponin prowadzona była na kolumnach z fazą związaną C₁₈. Znane są również przykłady zastosowania innych wypełnień kolumny, takich jak fazy związanej C₈ w analizie saponin steroidowych obecnych w kłączach trójki przedstawicieli rodzaju *Ruscus* [40], czy żelu krzemionkowego do analizy saponin triterpenowych pochodnych oleananu z rośliny *Solidago gigantea* [41]. Reznicek i in. [41] w swojej pracy, oprócz kolumny z wypełnieniem żelem krzemionkowym, przeprowadzali separację saponin także na kolumnie typu C₈. Autorzy doszli do wniosku, że peten rozdział czterech głównych saponin przy użyciu tylko jednego rodzaju sorbentu jest w tym przypadku niemożliwy.

W innym artykule opisano zastosowanie kolumn ze związaną fazą aminową, na której rozdzielano m.in. saponiny steroidowe, czy z fazą typu Diol do oznaczania saponin, pochodnych oleananu [21].

Tabela 2. Różne warunki rozdzielania chromatograficznego saponin metodą HPLC.

Saponiny	Próbka	Metoda	Warunki chromatograficzne	Ref.
Pochodne furostanowe i spirostanowe.	<i>Dioscorea nipponica</i> - suchy ekstrakt.	HPLC-UV-MS	Eluent: CH ₃ CN/H ₂ O Kolumna: C ₁₈ ; temp. kol. = 25 °C V = 1,0 ml/min; czas analizy = 60 min.	[45]
Pochodne furostanowe i spirostanowe.	<i>Ruscus aculeatus</i> , <i>Ruscus hypoglossum</i> i <i>Ruscus colchicus</i>	HPLC-UV	Eluent: H ₂ O/CH ₃ CN. Kolumna: C ₈ ; temp. kol. = 20 °C V = 1,0 ml/min; czas analizy = 65 min.	[40]
Pochodne oleananu	<i>Stephanotis mucronata</i> - korzenie	HPLC-UV	Eluent: H ₂ O/CH ₃ OH Kolumna: C ₁₈ temp. kol. = 25 °C V = 0,8 ml/min; czas analizy = 40 min.	[44]
Pochodne dammaranu	<i>Panax notoginseng</i>	HPLC-UV	Eluent: CH ₃ CN/ 0,001% HCOOH Kolumna: C ₁₈ temp. kol. = 25 °C V = 0,8 ml/min; czas analizy = 30 min.	[46]
Pochodne ursanu	<i>Centella asiatica</i> - hodowle tkankowe z today	HPLC-DAD	Eluent: CH ₃ CN/H ₂ O Kolumna: C ₁₈ temp. kol. = 25 °C V = 1,0 ml/min; czas analizy = 45 min.	[47]

4.2.2. Rodzaje stosowanych faz ruchomych i dodatków

W chromatografii saponin w odwróconym układzie faz stosuje się przeważnie mieszaniny wody i acetonitrylu, względnie wody i metanolu.

Wykorzystanie metanolu utrudnia jednak analizę saponin przy stosowaniu detektorów spektrofotometrycznych UV ze względu na nakładanie się sygnałów odpowiadających tym związkom z sygnałami pochodzącymi od rozpuszczalnika. Wynika to z tego, że saponiny wykazują absorpcję tylko przy najniższych długościach fal UV, zbliżonych do granicznej długości fali UV pochłanianej przez metanol [21,42,43]. Mimo tej trudności dość często stosuje się jako eluenty różne mieszaniny z metanolem, np. takiego eluentu użyto w oznaczaniu saponin pochodnych oleananu z korzeni *Stephanotis mucronata* [44]. W pracy tej Chen i in. nie zastosowali wcześniejszej derywatyzacji, wprowadzającej dodatkowe grupy chromoforowe, które polepszają detekcję UV saponin.

Często do eluentów stosowany jest dodatek kwasu trifluorooctowego i kwasu octowego jako modyfikatorów pH [21].

W pracy Reznicek i in. [41] dodatek TFA zapewnił dobry kształt pików pochodzących od saponin pochodnych oleananu, zawartych w *Solidago gigantea*.

Kwas trifluorooctowy może być złym wyborem, jeśli stosuje się połączenie HPLC-MS. Theunis i in. [48] oznaczali saponiny przy pomocy HPLC-MS z elektrorozpyleniem (ESI), jako metodą jonizacji. Biorąc pod uwagę, że TFA jest znany czynnikiem hamującym jonizację niezbędną dla detekcji MS, sami użyli dodatku kwasu mrówkowego.

4.2.3. Prędkość przepływu fazy ruchomej

Najczęściej stosowaną prędkością przepływu w pracach dotyczących analizy saponin metodą HPLC jest prędkość 1 ml/min.

W pracy [48], w której opracowywano i przeprowadzono walidacje, metody oznaczania saponin triterpenowych w *Maesa lanceolata* zastosowano przepływ 0,5 ml/min. Taki przepływ wiązał się z użyciem kolumny C₁₈ o średnicy wynoszącej 3,2 mm. Mała średnica pozwoliła nie tylko do-

stosować warunki rozdzielania do detekcji metodą MS, ale również umożliwiła lepszy rozdzielanie saponin.

4.2.4. Temperatura kolumny

Najczęściej rozdzielanie saponin metodą HPLC dokonuje się przy temperaturze termostatu wynoszącej 25 °C. W pracy [49] badano zawartość saponin w roślinie *Maesa lanceolata*. Autorzy zastosowali fazę ruchomą (CH₃CN + TFA (500:0.3, v:v) - H₂O + TFA (391:0.3, w:w) chłodzoną w łaźni z lodem w czasie całego procesu chromatografowania. Według nich niska temperatura fazy ruchomej miała zapobiegać tworzeniu się w niej pęcherzyków powietrza i poprawić separację saponin.

4.2.5. Czas analizy

Zwykle do zadawalającej separacji saponin wystarczy czas od 30 min. do niewiele ponad godziny.

Krótszy czas analizy uzyskali Qi i in. [50], którzy przy użyciu bardzo szczegółowo opracowanego gradientu (zmiany składu eluentu stosowano oddzielnie nawet dla jednodominowych odstępów czasu) przeprowadzili analizę saponin triterpenowych w tradycyjnym chińskim leku ziołowym Huangqi w czasie jedynie 20 minut.

4.2.6. Rodzaje detekcji stosowane w analizie saponin metodą HPLC

a. Detekcja w nadfiolecie

Brak odpowiednio silnych grup chromoforowych w cząsteczkach większości saponin powoduje, że maksima absorpcji tych związków wypadają w niewygodnym próżniowym zakresie UV, a w zakres średni wchodzi jedynie zboczka tych pasm. Wymusza to detekcje przy niespecyficznych, niskich długościach średniego zakresu fal UV, najczęściej 200-210 nm [21,42,43]. Wynikiem tego jest zarówno mała czułość detekcji tą metodą, jak i brak możliwości wykorzystania do chromatografii niektórych rozpuszczalników, absorbujących przy równie niskich długościach fali. Typowym przykładem jest tutaj metanol posiadający graniczną długość pochłanianej fali przy 200 nm.

Potencjalnym rozwiązaniem powyższego problemu mogłaby być derywatyzacja saponin. Jest to jednak technika

rzadko stosowana i odpowiedniejsze wydaje się użycie rozpuszczalników absorbujących przy jeszcze niższych długościach fali, np. acetonitrylu, dla których nie występują wcześniej opisywane komplikacje.

b. Detektor aerozolowy promieniowania rozproszonego (ELSD)

Metoda detekcji przy użyciu ELSD jest niezależna od obecności grup chromoforowych w związku, jest więc dobrą alternatywą wobec detektorów UV. Wykazuje się dobrą czułością i selektywnością i nie generuje takich kosztów jak np. MS [51]. Właśnie z tych wyżej wymienionych powodów ELSD zastosowano w połączeniu HPLC-DAD-ELSD w pracy Yi i in. [52]. Analizowano tam lek ziołowy zawierający różne związki naturalne, w tym saponiny.

c. Spektrometria mas (MS)

Wykorzystuje się tu najczęściej trzy sposoby jonizacji: metoda termorozpylania (TE), bombardowania szybkimi atomami (FAB) i elektrorozpylania (ESI) [21]. Połączenie HPLC-MS jest obecnie używane do identyfikacji saponin o dużym znaczeniu farmakologicznym w ekstraktach roślin takich jak *Panax ginseng* - ginsenozydy czy *Glycine max* - sojasaponiny. Sojasaponiny z nasion soi *Glycine max* identyfikowali Fuzzati i in. [53] stosując połączenie HPLC-MS z termorozpylaniem jako metodą jonizacji. W swojej pracy udało się im rozdzielić i zidentyfikować zarówno aglikon jak i sekwencje części cukrowej sześciu różnych związków saponinowych.

d. Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego (NMR)

W identyfikacji produktów naturalnych uzyskanie informacji na temat rodzaju wiązań oraz sposobu powiązania atomów w cząsteczce jest często niezbędne. Stosowanie metod LC - MS i LC - UV nie zawsze wystarcza do otrzymania takich danych. Metodą pozwalającą na lepsze poznanie budowy związków występujących w ekstraktach roślinnych może być magnetyczny rezonans jądrowy NMR.

HPLC sprzężone z NMR nie jest metodą szeroko stosowaną głównie ze względu na niską czułość metody. Ulega to jednak zmianie dzięki zastosowaniu programów pulsowych z gradientem, tłumienia sygnałów pochodzących od rozpuszczalnika oraz magnesów nadprzewodzących o dużym polu. Największym problemem analizy z wykorzystaniem LC - NMR jest trudność obserwacji rezonansu analitu w obecności dużo większych sygnałów rezonansowych pochodzących od fazy ruchomej. Kolejnym utrudnieniem jest ograniczona możliwość stosowania gwałtownych zmian składu faz ruchomych, jak to się dzieje w przypadku elucji gradientowej, [54].

Stosowanie sekwencji impulsowej WET (Water suppression enhanced through T₁ effects), eliminującej sygnał wody przez odpowiednie wykorzystanie relaksacji spin-sieć pozwala na częściowe pokonanie tych problemów i uzyskanie dobrych widm niezawierających sygnału rozpuszczalnika [55].

Połączenie LC-NMR zostało wykorzystane w analizie saponin triterpenowych pochodnych dammaranu otrzymanych z suchych frakcji *Bacopa monniera* [56]. W pracy tej zastosowano wspomnianą wcześniej sekwencję WET. Otrzymano z dobrą czułością sygnały ¹H-NMR w opcji zatrzymanego przepływu, które pozwoliły na wyróżnienie dwóch regionów widma właściwych dla saponin triterpe-

nowych. Dobrą jakość sygnałów otrzymano również w trybie ciągłego przepływu.

5. Inne instrumentalne metody analityczne w analizie flawonoidów i saponin

5.1. Flawonoidy

a. Chromatografia gazowa (GC)

Chromatografia gazowa w badaniu flawonoidów straciła bardzo na znaczeniu w związku z upowszechnieniem się chromatografii cieczowej, a nowo opublikowane prace przeważnie nie zajmują się rozwijaniem tej metody [11].

Jednym z powodów takiego stanu rzeczy był wymóg derywatywacji badanych związków w celu zwiększenia ich lotności i stabilności termicznej [11]. Tworzy się w tym celu trimetylosilolowe pochodne [57]. W jednej z opublikowanych prac derywatywacja przy użyciu bis-trimetylosilotrifluoroacetamidu flawonoidu hesperydiny trwała 72 godziny [11].

W metodzie GC stosowane są kolumny mikrokapilarne z silikonowymi, ciekłymi fazami stacjonarnymi [11,57,60]. Obecnie w analizie saponin tą metodą stosuje się prawie wyłącznie aparaturę połączoną ze spektrometrem mas z jonizacją elektronami (EI) [11,57,58].

b. Elektroforeza kapilarna (CE)

Elektroforeza kapilarna w analizie związków roślinnych w niektórych przypadkach może być lepszym wyborem w porównaniu z HPLC. Niezaprzeczalnymi zaletami tej metody są krótki czas analizy, duża wydajność separacji oraz małe zużycie analitu i odczynników, co ma znaczenie w aspekcie kosztów i bezpieczeństwa dla środowiska [59,60].

Wadą stosowanych w metodzie CE detektorów spektrofotometrycznych jest mniejsza czułość detekcji w stosunku do HPLC, co spowodowane jest krótką drogą optyczną wynikającą z małej średnicy kapilary. Ta niedoskonałość została podkreślona również w pracy Kőcevar i in. [61], gdzie porównano metody CE-UV oraz HPLC-UV i walidowano je pod kątem wykrywania flawonoidów z *Achillea millefolium* należących do grupy flawonów i flawonoli. Jak twierdzą autorzy, różnica między czułością CE i HPLC w ich analizie nie była jednak istotnie znacząca. Gorsza czułość detektorów spektrofotometrycznych w CE może być w przyszłości wyeliminowana poprzez stosowanie nowoczesnych komórek pomiarowych lub kapilar o rozszerzonej drodze światła [60].

Dobrym rozwiązaniem może też być sprzęgnięcie CE z detekcją elektrochemiczną [59].

W analizie flawonoidów stosuje się najczęściej dwa niżej wymienione rodzaje elektroforezy kapilarnej.

A. *Micelarna elektrokinetyczna chromatografia kapilarna (MEKC)*. MEKC wykorzystana została w analizie 3 flawonoidów z rośliny *Paulownia tomentosa* [62].

B. *Strefowa elektroforeza kapilarna (CZE)*. Metodę strefowej elektroforezy kapilarnej zastosowali Ren i in. w jednoczesnej analizie 9 flawonoidów obecnych w tybetańskim preparacie *Anaphalis margaritacea* [63].

Porównania tych dwóch typów CE w oznaczaniu związków flawonoidowych podjęli się w swojej pracy Wang i in. [64], analizując 13 flawonoidów, najbardziej rozpowszechnionych w roślinach leczniczych. Autorzy ci uznali, że micelarna elektrokinetyczna chromatografia kapilarna (MEKC)

sprawdza się lepiej, pozwalając na uzyskanie większej selektywności rozdzielenia mieszaniny. Taki wynik związany jest z odmiennością zachowania się elektroforetycznego flawonoidów w obu trybach elektroforezy.

c. Cienkowarstwowa chromatografia cieczowa (TLC)

Mimo iż początki zastosowania metody TLC w analizie flawonoidów sięgają wczesnych lat 60-tych, chromatografia cienkowarstwowa nadal odgrywa ważną rolę w analizie tych związków [11]. Obecnie spełnia głównie rolę pomocniczą w badaniach wykorzystujących inne techniki, jak HPLC, np. w analizie C- glikozydów z liści *Cucumis dativus* [65]. Stosowana jest też z powodzeniem jako główna metoda analityczna np. w badaniu koncentratu z rośliny *Salvia sclarea*, w którym Shepeli i in. [66] wykryli tą metodą po raz pierwszy takie flawonoidy jak kwercytrynę, juglaninę czy kemferol.

Wykorzystując fluorescencję flawonoidów w świetle UV, na płytkach można odróżnić poszczególne grupy flawonoidów po kolorze fluorescencji plamy, odpowiednio: żółta - oznacza flawonole, izoflawony, auronony; natomiast brązowa - flawony, ich aglikony, glikozydy flawonolowe, chalcony [3].

W identyfikacji pomóc mogą też reakcje z solami metali, np. 2% metanolowy roztwór tlenochlorku cyrkonowego zabarwia na żółto flawonoidy posiadające wolne grupy hydroksylowe przy atomach węgla 3 i 5 [3].

5.2. Saponiny

a. Chromatografia gazowa (GC)

Saponiny, podobnie jak flawonoidy, ze względu na polarność cząsteczek i dużą masę poddaje się derywatywacji. Przekształca się je w metylowe, acetylowe i trimetylosilylowe etery, dotyczy to jednak praktycznie tylko aglikonów niezwiązanych z częściami cukrowymi [21]. Saponiny związane posiadające część cukrową poddaje się hydrolizie.

W pracy Ruiz i in. [67] opisano badania zawartości saponin w uprawach soczewicy. Saponiny (głównie sojasaponiny) hydrolizowano do wolnego sapogenolu chlorkiem acetylu i poddawano derywatywacji z bistrimetylosilylotri-fluoroacetamidem i pirydyną. W innej pracy analizę GC-MS wykorzystano do identyfikacji samych monosacharydów (glukozy, galaktozy, kwasu glukuronowego), części cukrowych otrzymanych po hydrolizie związanych saponin, pochodnych oleananu [68].

b. Elektroforeza kapilarna (CE)

CE jest techniką cały czas rozwijaną w analizie saponin. Mała ilość dotychczasowych publikacji opisujących zastosowanie metody CE do badania tej grupy związków wynika, podobnie jak w przypadku flawonoidów, z niemożności oznaczania niskich stężeń, a więc z trudności uzyskania niskich limitów detekcji. Możliwość rozdzielenia bardzo niewielkich ilości substancji kłóci się tu z wymogiem stosowania względnie dużych stężeń analitu na potrzeby detekcji. Spowodowane jest to niedoskonałością istniejących sposobów detekcji dla tej metody [21]. Publikowane badania wydają się jednak być bardzo obiecujące i można się spodziewać szybkiego rozwoju CE w analizie saponin.

Kwaśną saponinę triterpenową, glicyryzynę, obok kilkunastu innych związków z klasy antrachinonów, flawonoidów i kwasów karboksylowych, oznaczano razem w tradycyjnym chińskim leku ziołowym I-tzu-tang metodą HPLC i

CE. Sheu i in. [69] uznali, że obie te metody w opracowanych przez nich warunkach nadają się do analizy mieszaniny wyżej wspomnianych związków, jednak technika CE jest bardziej użyteczna. Analiza HPLC trwała w ich badaniu 50 min. i rozdzielono 8 spośród 12 związków, dla CE proces ten trwał 14 min. i dokonano rozdzielenia 11 związków (dla gliceryzyny odpowiednio czas retencji wyniósł około 40 min., a czas migracji około 10 min.). Obie metody wykazały się dobrymi parametrami liniowości, akceptowalną powtarzalnością oraz odzyskiem.

Micelarna elektrokinetyczna chromatografia kapilarna, jeden z typów CE, została zastosowana w analizie saikosaponin w innym tradycyjnym leku ziołowym Chair-Hwu (korzeń Bupleuri). Autorzy optymalizowali metodę pod kątem typu stosowanych buforów i dodatku modyfikatorów. Otrzymali najlepsze warunki rozdzielenia stosując mieszaniny γ -cyklodekstryny i dodecylsulfianu sodu (SDS) lub SDS i eteru dodecylowego glikolu polioxaetylenowego (Brij 35). Rozdzieleniu mieszaniny 5 różnych standardowych saikosaponin do linii podstawowej dokonano w tych warunkach w czasie poniżej 7 min. Stwierdzono, że metoda ta może być z powodzeniem stosowana do szybkiej analizy jakościowej związków biologicznie czynnych stanowiących składniki szeregu tradycyjnych chińskich leków ziołowych [70].

c. Cienkowarstwowa chromatografia cieczowa (TLC)

Cienkowarstwowa chromatografia cieczowa jest techniką coraz częściej wykorzystywaną nie jako główny instrument analityczny, ale jako wsparcie dla innych technik [42]. Przykładem jest praca Estrada i in. w której opisano identyfikację saponin z korzeni *Polygala senega*. Przy pomocy HPLC badano profil saponinowy frakcji, w których potwierdzono obecność saponin za pomocą TLC [71].

Stosowanie TLC niesie pewne korzyści względem HPLC, jak: brak konieczności dokładnego oczyszczania próbek ze względu na jednorazowość stosowanych płytek (w HPLC zanieczyszczenia mogą powodować spadek zdolności rozdzielczej fazy stacjonarnej), możliwość jednoczesnego wykonywania kilku analiz i późniejszego przechowywania płytek oraz większą liczbę sposobów detekcji [21]. TLC wciąż jest też jedną z głównych metod stosowanych w Farmakopei Europejskiej w badaniach jakości surowców saponinowych [72].

6. Podsumowanie

Prezentowany artykuł jest przeglądem literaturowym metod chromatograficznych, głównie wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC), wykorzystywanych w analizie ekstraktów roślinnych zawierających w swoim składzie flawonoidy i saponiny. Przedstawiono charakterystykę flawonoidów i saponin, zaprezentowano sposoby przygotowania próbki do analizy: ekstrakcję, izolację i zażęzanie analitów, omówiono optymalizację warunków chromatograficznych: dobór kolumny, warunków elucji oraz zastosowanie odpowiedniego typu detekcji. Scharakteryzowano też inne metody separacyjne, takie jak chromatografia gazowa (GC), cienkowarstwowa chromatografia cieczowa (TLC) oraz elektroforeza kapilarna (CE) stosowane w analizie flawonoidów i saponin.

WYKAZ SYMBOLI I SKRÓTÓW

DAD	Detektor z matrycą diodową
HPLC	Wysokosprawna chromatografia cieczowa
HSC-2	Komórki nowotworu płaskokomórkowego
Brij 35	Eter dodecyłowy glikolu polioksaetylenowego
CE	Elektroforeza kapilarna
CZE	Strefowa elektroforeza kapilarna
EI	Jonizacja elektronami
ELSD	Detektor aerozolowy promieniowania rozproszonego
ESI	Elektrozpylanie
FAB	Bombardowanie szybkimi atomami
GC	Chromatografia gazowa
LC	Chromatografia cieczowa
MAE	Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomaganą promieniowaniem mikrofalowym
MEKC	Micelarna elektrokinetyczna chromatografia kapilarna
MS	Spektrometria mas
MSPD	Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika z próbki zmieszanej z wypełniaczem
NMR	Spektroskopia magnetycznego rezonansu jądrowego
PEG	Polietylenoglikol
SDS	Dodecylosiarczanu sodu
SPE	Ekstrakcja do fazy stałej
SPME	Mikroekstrakcja do fazy stałej
SFE	Ekstrakcja za pomocą płynu w stanie nadkrytycznym
TE	Termorozpylanie
TFA	Kwas trifluorooctowy
TLC	Cienkowarstwowa chromatografia cieczowa
UAE	Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomaganą ultradźwiękami
WET	Technika tłumienia sygnału wody wzmocniona przez efekt czasu relaksacji T1

BIBLIOGRAFIA

- Kohl Münzer, S. Farmakognozja. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, 2007.
- Iwashina, T. The structure and distribution of the flavonoids in plants. J. Plant. Res., 2000, 113, 287-299.
- Strzelecka, H.; Kamińska, J.; Kowalski, J.; Malinowski, J.; Walewska, E. Chemiczne metody badań roślinnych surowców leczniczych. Państwowy Zakład Wydawnictw Lekarskich, Warszawa 1987.
- Di Carlo, G.; Mascolo, N.; Izzo, A.; Capasso, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. Life Sci., 1999, 65, 337-53.
- Kris-Etherton, P.M.; Keen, C.L. Evidence that the antioxidant flavonoids in tea and cocoa are beneficial for cardiovascular health. Curr. Opin. Lipidol., 2002, 13, 41-49.
- Makdessi, S.A.; Sweidan, H.; Dietz, K.; Jacob, R. Protective effect of *Crataegus oxyacantha* against reperfusion arrhythmias after global no-flow ischemia in the rat heart. Basic Res. Cardiol., 1999, 94, 71 - 77.
- Gennari, M.C.; Adami, S.; Agnusdei, D.; Bufalino, L.; Cervetti, R.; Crepaldi, G.; Di Marco, C.; Di Munno, O.; Fantasia, L.; Isaia, G.C.; Mazzuoli, G.F.; Ortolani, S.; Passeri, M.; Semi, U.; Vecchiet, L. Effect of Chronic Treatment with Ipriflavone in Postmenopausal Women with Low Bone Calcif Tissue. Int., 1997, 61, 19-22.
- Kuntz, S.; Wenzel, U.; Daniel, H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. Eur. J. Nutr., 1999, 38, 133-142.
- Vincken, J.P.; Heng, L.; de Groot, A.; Gruppen, H. Saponins, classification and occurrence in the plant kingdom. Phytochem., 2007, 68, 275-297.
- Sparg, S.G.; Light, M.E.; van Staden, J. Biological activities and distribution of plant saponins. J. Ethnopharmacol., 2004, 94, 219-243.
- de Rijke, E.; Out, P.; Niessen, W.M.A.; Ariese, F.; Gooijer, C.; Brinkman, U.A.Th. Analytical separation and detection methods for flavonoids. J. Chromatogr. A, 2006, 1112, 31-63.
- Shoeb, M.; Jaspars, M.; MacManus, S.M.; Celik, S.; Nahar, L.; Kong-Thoo-Lin, P.; Sarker, S.D. Anti-colon cancer potential of phenolic compounds from the aerial parts of *Centaurea gigantea* (Asteraceae). J. Nat. Med., 2007, 61, 164-169.
- Copaja, S.V.; Blackburn, C.; Carmona, R. Variation of saponin contents in *Quillaja saponica* Molina. Wood Sci. Technol., 2003, 37, 103-108.
- Weihua X.; Lujia H.; Bo S. Microwave-assisted extraction of flavonoids from *Radix Astragali*. Sep. Purif. Technol., 2008, 62, 614-618.
- Yi Ch.; Ming-Yong X.; Xiao-Feng G. Microwave-assisted extraction used for the isolation of total triterpenoid saponins from *Ganoderma atrum*. J. Food Engineer., 2007, 81, 162-170.
- Sandvoss, M.; Weltring, A.; Preiss, A.; Levsen, K.; Wuensch, G. Combination of matrix solid-phase dispersion extraction and direct on-line liquid chromatography-nuclear magnetic resonance spectroscopy-tandem mass spectrometry as a new efficient approach for the rapid screening of natural products: Application to the total asterosaponin fraction of the starfish *Asterias Rubens*. J. Chromatogr. A, 2001, 917, 75-86.
- Scalia, S.; Giuffreda, L.; Pallado, P. Analytical and preparative supercritical fluid extraction of *Chamomile* flowers and its comparison with conventional methods. J. Pharmaceutic. Biomed., 1999, 21, 549-558.
- Govindarajan, R.; Singh, D.P.; Rawat, A.K.S. High-performance liquid chromatographic method for the quantification of phenolics in 'Chyavanprash' a potent Ayurvedic drug. J. Pharmaceutic. Biomed., 2007, 43, 527-532.
- Ying-Jie W.; Lian-Wen Q.; Ping L.; Hou-Wei L.; Ling Y.; Liang-Hong S. Improved quality control method for Fufang Danshen preparations through simultaneous determination of phenolic acids, saponins and diterpenoid quinones by HPLC coupled with diode array and evaporative light scattering detectors. J. Pharmaceutic. Biomed., 2007, 45, 775-784.
- Kakasy, A.; Füzfa, Z.; Kursinszki, L.; Molnár-Perl, I.; Lemberkovic, E. Analysis of non-volatile constituents in *Dracocephalum* species by HPLC and GC-MS. Chromatographia, 2006, 63, 17-22.
- Oleszek, W.A. Chromatographic determination of plant saponins. J. Chromatogr. A, 2002, 967, 147-162.
- Parejo, I.; Caprai, E.; Bastida, J.; Viladomat, F.; Jáuregui, O.; Codina, C. Investigation of *Lepechinia graveolens* for its antioxidant activity and phenolic composition. J. Ethnopharmacol., 2004, 94, 175-184.
- Harnly, J.M.; Bhagwat, S.; Long-Ze Lin. Profiling methods for the determination of phenolic compounds in foods and dietary supplements. Anal. Bioanal. Chem., 2007, 389, 47-61.
- Pinelli, P.; Agostini, F.; Comino, C.; Lanteri, S.; Portis, E.; Romani, A. Analytical Nutritional and Clinical Methods Simultaneous quantification of caffeoyl esters and flavonoids in wild and cultivated cardoon leaves. Food Chem., 2007, 105, 1695-1701.
- Filipa, R.; López, P.; Gibertib, G.; Coussio, J.; Ferraro, G. Phenolic compounds in seven South American *Ilex* species. Fitoterapia, 2001, 72, 774-778.
- Bendini A.; Bonoli, M.; Cerretani, L.; Biguzzi, B.; Lercker, G.; Toschi, T.G. Liquid-liquid and solid-phase extractions of phenols from virgin olive oil and their separation by chromatographic and electrophoretic methods. J. Chromatogr. A, 2003, 985, 425-433.
- Marin, P.D.; Grayer, R.J.; Kite, G.C.; Matevski, V. External leaf flavonoids of *Thymus* species from Macedonia. Biochem. Syst. Ecol., 2003, 31, 1291-1307.
- Ling Y.; Lian-Wen Q.; Ping L.; Yi-Han M.; Yong-Jing L.; Hai-Yun L.; Simultaneous determination of bioactive constituents in Danggui Buxue Tang for quality control by HPLC coupled with a diode array detector, an evaporative light scattering detector and mass spectrometry, Anal. Bioanal. Chem., 2007, 389, 571-580.

29. Citoglu, G.S.; Yilmaz, B.S.; Tarikahya, B.; Tipirdamaz, R. Chemotaxonomy of *Ballota* species. *Chemistry of Natural Compounds*, 2005, 41, 299-302.
30. Pellati, F.; Benvenuti, S.; Melegari, M. Chromatographic performance of a new polar poly(ethylene glycol) bonded phase for the phytochemical analysis of *Hypericum perforatum* L. *J. Chromatogr. A*, 2005, 1088, 205-217.
31. Huck, C.W.; Buchmeiser, M.R.; Bonn, G.K. Fast analysis of flavonoids in plant extracts by liquid chromatography-ultraviolet absorbance detection on poly(carboxylic acid)-coated silica and electrospray ionization tandem mass spectrometric detection. *J. Chromatogr. A*, 2001, 943, 33-38.
32. Huaifu W.; Provan G.J.; Helliwell K. HPLC determination of catechins in tea leaves and tea extracts using relative response factors. *Food Chem.*, 2003, 81, 307-312.
33. Merken, H.M.; Beecher, G.R. Liquid chromatographic method for the separation and quantification of prominent flavonoid aglycones. *J. Chromatogr. A*, 2000, 897, 177-184.
34. Keinänen, M.; Julkunen-Tiitto, R. High-performance liquid chromatographic determination of flavonoids in *Betula pendula* and *Betula pubescens* leaves. *J. Chromatogr. A*, 1998, 793, 370-377.
35. Rong-Xia L.; Qiao W.; Hong-Zhu G.; Li L.; Kai-Shun B.; De-An G. Simultaneous determination of 10 major flavonoids in *Dalbergia odorifera* by high performance liquid chromatography. *J. Pharmaceut. Biomed.*, 2005, 39, 469-476.
36. Rodriguez-Delgado, M.A.; Malovaná, S.; Pérez, J.P.; Borgesa, T.; Montelongo, G.F.J. Separation of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography with absorbance and fluorimetric detection. *J. Chromatogr. A*, 2001, 912, 249-257.
37. Hollman, P.C.H.; van Trijp, J.M.P.; Buysman, M.N.C.P.; v.d. Gaag, M.S.; Mengelers, M.J.B.; de Vries, J.H.M.; Katan, M.B. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. *FEBS Letters.*, 1997, 418, 152-156.
38. Stobiecki, M.; Skirycz, A.; Kerhoas, L.; Kachlicki, P.; Muth, D.; Einhorn, J.; Mueller-Roeber, B. Profiling of phenolic glycosidic conjugates in leaves of *Arabidopsis thaliana* using LC/MS. *Metabolomics*, 2006, 2, 197-219.
39. Moco, S.; Li-Hong Tseng; Spraul, M.; Zheng Chen, J. Vervoort, J. Building-up a comprehensive database of flavonoids based on nuclear magnetic resonance data. *Chromatographia*, 2006, 64, 503-508
40. de Combarieu, E.; Falzoni, M.; Fuzzati, N.; Gattesco, F.; Giori, A.; Lovati, M.; Pace, R. Identification of *Ruscus* steroidal saponins by HPLC-MS analysis. *Fitoterapia*, 2002, 73, 583-596.
41. Reznicek, G.; Freiler, M.; Schader, M.; Schmidt, U. Determination of content and composition of the main saponins from *Solidago gigantea* AIT. Using high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr. A*, 1996, 755, 133-137.
42. Oleszek, W.; Bialy, Z. Chromatographic determination of plant saponins-An update (2002-2005). *J. Chromatogr. A*, 2006, 1112, 78-91.
43. Kite, G.C.; Porter, E.A.; Monique, Simmonds, M.S.J. Chromatographic behavior of steroidal saponins studied by high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 2007, 1148, 177-183
44. Juanjuan Ch.; Yiping Y.; Cuirong S.; Yuanjiang P. Rapid identification of oleanane-type saponins in the roots of *Stephanotis mucronata* by liquid chromatography/electrospray tandem mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 2008, 613, 74-82.
45. Shuhai L.; Dongmei W.; Depo Y.; Junhua Y.; Yao T.; Jianping Ch. Characterization of steroidal saponins in crude extract from *Dioscorea nipponica* Makino by liquid chromatography tandem multi-stage mass spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 2007, 599, 98-106.
46. Lie L.; Jin-Lan Z.; Yu-Xin S.; De-An G.; Qiao W.; Hong-Zhu G. Simultaneous quantification of six major active saponins of *Panax notoginseng* by high-performance liquid chromatography-UV method. *J. Pharmaceut. Biomed.*, 2005, 38, 45-51.
47. Jacinda, T.; Meyer, J.R.; Dubery, I.A. Characterisation of two phenotypes of *Centella asiatica* in Southern Africa through the composition of four triterpenoids in callus, cell suspensions and leaves. *Plant Cell. Tiss. Org.*, 2008, 94, 91-99.
48. Theunis, M.; Foubert, K.; Pollier, J.; Gonzalez-Guzman, M.; Goossens, A.; Vlietinck, A.J.; Pieters, L.A.C.; Apers, S.; Determination of saponins in *Maesa lanceolata* by LC-UV: Development and validation. *Phytochem.*, 2007, 68, 2825-2830.
49. Apers, S.; Foriers, A.; Sindambiwe, J.B.; Vlietinck, A.; Pieters, L. Separation of a triterpenoid saponin mixture from *Maesa lanceolata*: semipreparative reversed-phase wide pore high performance liquid chromatography with temperature control. *J. Pharmaceut. Biomed.*, 1998, 18, 737-743.
50. Lian-Wen Q.; Jun C.; Ping L.; Qing-Tao Y.; Xiao-Dong W.; Yu-Xia W.; Chang-Yin L.; Kang-De B.; Xiao-Xiao G.; Xiao-Lan Ch. Qualitative and quantitative analysis of Radix Astragali products by fast high-performance liquid chromatography-diode array detection coupled with time-of-flight mass spectrometry through dynamic adjustment of fragmentor voltage. *J. Chromatogr. A*, 2008, 1203, 27-35.
51. Honglan W., Jie G., Danni Z., Boyang Y. Quality evaluation of *Polygala japonica* through simultaneous determination of six bioactive triterpenoid saponins by HPLC-ELSD. *J. Pharmaceut. Biomed.*, 2007, 43, 1552-1556.
52. Ling Y.; Lian-Wen Q.; Ping L.; Yi-Han M.; Yong-Jing L.; Hai-Yun L. Simultaneous determination of bioactive constituents in Danggui Buxue Tang for quality control by HPLC coupled with a diode array detector, an evaporative light scattering detector and mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 389, 571-580.
53. Fuzzati, N.; Pace, R.; Papeo, G.; Peterlongo, F. Identification of soyasaponins by liquid chromatography-thermospray mass spectrometry. *J. Chromatogr. A*, 1997, 777, 223-238.
54. Keifer, P.A. Flow NMR applications in combinatorial chemistry. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2003, 7, 388-394.
55. Wolfender, J.L.; Rodriguez, S.; Hostettmann, K. Liquid chromatography coupled to mass spectrometry and nuclear magnetic resonance spectroscopy for the screening of plant constituents. *J. Chromatogr.*, 1998, 794, 299-316.
56. Renukappa, T.; Roos, G.; Klaiber, I.; Vogler, B.; Kraus, W. Application of high-performance liquid chromatography coupled to nuclear magnetic resonance spectrometry, mass spectrometry and bioassay for the determination of active saponins from *Bacopa monniera* Wettst. *J. Chromatogr. A*, 1999, 847, 109-116.
57. Maul, R.; Schebb, N.H.; Kulling, S.E. Application of LC and GC hyphenated with mass spectrometry as tool for characterization of unknown derivatives of isoflavonoids. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, 391, 239-250.
58. Blazics, B.; Ludanyi, K.; Szarka, S.; Kery, A. Investigation of *Euphrasia rostkoviana* Hayne Using GC-MS and LC-MS. *Chromatographia*, 2008, 68, 119-124.
59. Xueqin X.; Hongzhi Y.; Wei W.; Lishuang Y.; Guonan Ch.. Determination of flavonoids in *Houttuynia cordata* Thunb. and *Saururus chinensis* (Lour.) Bail. by capillary electrophoresis with electrochemical detection. *Talanta*, 2006, 68, 759-764.
60. Suntornsuk, L. Capillary electrophoresis of phytochemical substances. *J. Pharmaceut. Biomed.*, 2002, 27, 679-698.
61. Kőcevar, N.; Glavč, I.; Injac, R.; Kreft, S. Comparison of capillary electrophoresis and high performance liquid chromatography for determination of flavonoids in *Achillea millefolium*. *J. Pharmaceut. Biomed.*, 2008, 46, 609-614.
62. Ting-Fu J., Xin D., Yan-Ping S. Determination of flavonoids from *Paulownia tomentosa* (Thunb) Steud by micellar electrokinetic capillary electrophoresis. *Chromatographia*, 2004, 59, 255-258.
63. Zhao-Yan R.; Yu Z.; Yan-Ping S. Simultaneous determination of nine flavonoids in *Anaphalis margaritacea* by capillary zone electrophoresis. *Talanta*, 2009, 78, 959-963.
64. Wang, S.F.; Zhang, J.Y.; Chen, X.G.; Hu, Z.D. Study of the Electrophoretic Behaviour of Flavonoids. *Chromatographia* 2004, 59, 507-511
65. Krauze-Baranowska, M.; Cisowski, W. Flavonoids from some species of the genus *Cucumis*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 2001, 29, 321-324.
66. Shepeli, D.F. Studying the composition of Salmus preparation. *Pharm. Chem. J.* 2005, 39, 428-432.
67. Ruiz, R.G.; Price, K.R.; Rose, M.E.; Fenwick, G.R. Effect of seed size and testa colour on saponin content of Spanish lentil seed. *Food Chem.*, 1997, 58, 223-226.
68. Dini, I.; Tenore, G.C.; Dini, A. Saponins in *Ipomoea batatas* tubers: Isolation, characterization, quantification and antioxidant properties. *Food Chem.*, 2009, 113, 411-419.
69. Shuenn-Jyi S.; Hong-Ren Ch. Simultaneous determination of twelve constituents of I-tzu-tang, a Chinese herbal preparation, by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. A*, 1995, 704, 141-148.

70. You-Zung Hsieh; His-Ya Huang. Determination of saikosaponins by micellar electrokinetic capillary chromatography. J. Chromatogr. A. 1997, 759, 193-201.
71. Estrada, A.; Katselis, G. S.; Laarveld, B.; Bart, B. Isolation and evaluation of immunological adjuvant activities of saponins from *Polygala senega* L. Comp. immunol. microb. 2000, 23, 27-43.
72. Apers, S.; Naessens, T.; Pieters, L.; Vlietinck, A. Densitometric thin-layer chromatographic determination of aescin in a herbal medicinal product containing *Aesculus* and *Vitis* dry extracts. J. Chromatogr. A. 2006, 1112, 165-170.